# This Page Is Inserted by IFW Operations and is not a part of the Official Record

# **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

## IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning documents will not correct images, please do not report the images to the Image Problem Mailbox.

19 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

#### INSTITUT NATIONAL DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

**PARIS** 

11) N° de publication :

(à n'utiliser que pour les commandes de reproduction)

(21) N° d'enregistrement national :

94 01530

2 715 938

(51) Int CI<sup>6</sup>: C 12 N 7/01, C 07 H 21/00, C 12 Q 1/68, A 61 K 31/70, 38/16, C 07 K 14/15

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

**A1** 

- 22 Date de dépôt : 04.02.94.
- (30) Priorité :

4

- (71) Demandeur(s) : Société Anonyme dite: BIO MERIEUX — FR.
- Date de la mise à disposition du public de la demande : 11.08.95 Bulletin 95/32.
- (56) Liste des documents cités dans le rapport de recherche préliminaire : Se reporter à la fin du présent fascicule.
- Références à d'autres documents nationaux apparentés :
- (2) Inventeur(s) : Perron Hervé, Mallet François, Mandrand Bernard, Bedin Frédéric et Beseme Frédéric.
- 73) Titulaire(s) :
- (74) Mandataire : Cabinet Germain & Maureau.
- 54 Constituents nucléiques du virus MSRV1, associé à la sciérose en plaques.
- (57) L'invention conceme un virus humain, possédant une activité transcriptase inverse, associé à une famille d'éléments rétroviraux endogènes, et associé à la sclérose en plaques, caractérisé en ce que son génome comprend une séquence nucléotidique présentant au moins 50 % et de préférence au moins 70 % d'homologie avec une séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID N01, SEQ ID N02, SEQ ID N03, SEQ ID N04, SEQ ID N05 et leurs séquences complémentaires.

L'invention concerne en outre les constituants nucléiques desdits virus et leurs utilisations.



# Constituants nucléiques du virus MSRV1, associé à la sclérose en plaques

La Sclérose en Plaques (SEP) est une maladie démyélinisante du système nerveux central (SNC) dont la 5 cause reste encore inconnue.

De nombreux travaux ont étayé l'hypothèse d'une étiologie virale de la maladie, mais aucun des virus causal s'est avèré l'agent connus testés ne être recherché: une revue des virus recherchés depuis 10 années dans la SEP a été faite par E. Norrby (Prog. Med. Virol., 1978; 24, 1-39) et R.T. Johnson (dans "Handbook of clinical neurology, 47 Demyelinating diseases". Vinken P. Bruyn G.W., eds. Amsterdam, Elsevier et Publishing, 1985, 319-336). Parallèlement, la possibilité 15 d'un facteur exogène et/ou infectieux est suggérée par l'existence d'épidémies localisées ou "clusters" de SEP comme ce qui a été observé dans les Iles Feroes entre 1943 et 1960 (Cook 1980), en Sardaigne (Rosati, 1988), Norvège (Riisse, 1991), ainsi que par les études sur les 20 migrants (Elian, 1990). Parmi tous les facteurs exogènes suggérés, les virus ont été étudiés le plus souvent et une étiologie virale est classiquement évoquée.

L'observation, dans la SEP. đе phénomènes assimilables à une réaction d'auto-immunité a conduit à 25 une hypothèse étiologique auto-immune "essentielle" (voir: Lisak R.P., Zweiman B. New Engl. J. Med. 1977; 297, 850-853, et, Lassmann H. et Wisniewski H.M. Arch. Neurol. 490-497) . Cependant, cette auto-immunité 36, dirigée contre certains composants du SNC s'est révèlée la 30 peu SEP et fréquente dans spécifique de inflammations du SNC, associées ou non à une infection, Hirayama M. et coll. ainsi que cela a été montré par (Neurology 1986; 36, 276-8), Kenneth G. Warren et coll. (Annals of Neurology 1986; 20, 20-25), Suzumura A. 35 coll. (Journal of Neuroimmunology 1986; 11, 137-47), et, Tourtelotte W. et coll. (Journal of Neurochemistry 1986;

46, 1086-93). De plus, comme l'a fait remarquer E.J. Field 1989; I, 1272.) aucune des thérapeutiques (The Lancet immunosuppressives n'a permis d'obtenir des résultats décisifs contre la SEP. Il semble maintenant probable que les manifestations "auto-immunes" sont induites par un mecanisme d'origine virale : co-sensibilisation determinants viraux associés à des molécules d'origine phénomènes de mimétisme moléculaire -comme cellulaire, cela a été décrit par Fujinami R.S et Oldstone M.B.A. "Molecular mimicry : Cross-reactivity between microbes and host proteins as a cause of autoimmunity". Oldstone M.B.A., ed.. Current Topics in Microbiology and Immunology, vol. 145, Berlin, Springer-Verlag, 1989) - ou, selon P. Rudge (Journal of Neurology, Neurosurgery and 54, 853-855), expression 15 Psychiatry, 1991 par superantigènes rétroviraux .

Des travaux ont étayé une hypothèse selon laquelle un Rétrovirus serait à l'origine de la maladie : découverte récente par A. Gessain et coll. (J. Infect. 1988; 1226-1234), de syndromes neurologiques Disease associés au virus HTLV-I, connu à l'origine comme agent de leucémies T de l'adulte, a conduit de nombreux auteurs, tels que H. Koprowski et coll. (Nature 1985; 318, 154), M.Ohta et coll. (J. Imunol. 1986; 137, 3440), E. P. Reddy 25 et coll. (Science 1989; 243, 529), S.J. Greenberg et coll. Sci. USA 1989; 86, Natl. Acad. 2878), Richardson et coll. (Science 1989; 246, 821), S.L. Hauser et coll. (Nature 1986; 322, 176) et A. Karpas et coll. (Nature 1986; 322, 177), à rechercher une implication de 30 ce rétrovirus humain dans la SEP, cependant sans succès ou avec des résultats évoquant des réactions croisées.

Par ailleurs, il existe un modèle animal très proche de la SEP, induit par un rétrovirus : le virus MAEDI-VISNA du mouton. Il est connu que l'infection 35 naturelle par ce virus peut provoquer deux types de maladies chez cet animal: le Maedi, une pneumonie

interstitielle lymphocytaire qui peut survenir lors de la primo-infection par ce rétrovirus et une pathologie neurologique démyélinisante tardive suivant généralement latence Visna. prolongée, le de physiopathologie du Visna naturel concorde avec la plupart des données cliniques et biologiques de la SEP, comme le rapportent Johnson R.T. (Rev. Infect. Dis. 1985; 7, 66-67), Narayan O. et Cork L.C. (Rev. Infect. Dis. 1985; 7, 89-98), et Nathanson N. et coll. (Rev. Infect. Dis. 1985; L'infection expérimentale des moutons par 10 75-82). inoculation intra-ventriculaire de souches neurovirulentes du virus VISNA a permis d'établir la responsabilité de ce virus dans la génèse de cette affection démyélinisante du mouton. Comme l'expliquent Nathanson N. et coll. (Rev. Infect. Dis. 1985; 7, 75-82), Hoffman P.M. et Panitch H.S. "Handbook of clinical neurology, 12 diseases" R.R. Mc Kendall, ed.. Elsevier science Publishing, Amsterdam, 1989, p 453-466), et A. (Nature 1986; 322, 130-136), elle diffère de l'infection conséquences ses neuropathologiques 20 par exacerbées, mais reste proche de la SEP. Il est de plus notable que, dans l'ensemble des travaux effectués sur ce sujet par les auteurs précités, notamment, le virus Visna est réqulièrement retrouvé dans les cellules de plexus choroïdes du cerveau qui constituent un site de latence et 25 réplication occasionnelle du provirus localisation de ces cellules à l'interface sang/liquide céphalo-rachidien (LCR) explique certainement ce phénomène.

Récemment, un rétrovirus, différent des rétrovirus
30 humains connus a été isolé chez des patients atteints de
SEP par H. Perron et coll. (Res. Virol. 1989; 140, 551561/ dans : "Current concepts in multiple sclerosis"
Wiethölter et coll., eds. Amsterdam, Elsevier, 1991, p.
111-116 / The Lancet 1991; 337, 862-863 ). Les auteurs ont
35 aussi pu montrer que ce rétrovirus pouvait être transmis
in vitro, que des patients atteints de SEP produisaient

des anticorps susceptibles de reconnaître des proteines associées à l'infection des cellules leptoméningées par ce rétrovirus et que l'expression de ce dernier pouvait être fortement stimulée par les gènes immédiats-précoces de certains herpesvirus (Perron et coll. Herpes simplex virus ICPO and ICP4 immediate-early proteins strongly enhance expression of a retrovirus harboured by a leptomeningeal cell-line from multiple sclerosis.1993. J. Gen. Virol. 74; 65-72).

Tous ces résultats plaident en faveur du rôle dans la SEP d'au mois un rétrovirus inconnu ou d'un virus ayant une activité transcriptase inverse détectable selon la méthode publiée par H. Perron et coll. (Res. Virol. 1989; 140, 551-561) et qualifiée d'activité "RT de type l5 LM7".

les travaux de la demanderesse ont Récemment, d'obtenir deux lignées continues de cellules des isolats naturels provenant infectées par patients différents atteints de SEP, par un procédé de culture tel que décrit dans la demande de brevet n° WO 20 93/20188. Ces deux lignées dérivées de cellules de plexuschoroïdes humains, dénommées LM7PC et PLI-2 ont déposées à l'E.C.A.C.C. respectivement le 22 juillet 1992 janvier 1993, sous les numéros 92072201 et le 8 93010817. conformément aux dispositions du traité 25 Budapest. Par ailleurs, les isolats viraux possédant une activité RT de type LM7 ont également été déposés à l'E.C.A.C.C. sous la dénomination globale de "souches". La "souche" ou isolat hébergé par la lignée PLI-2, dénommée le 22 juillet 1992 sous été déposée 30 V92072202. La "souche" ou isolat hébergé par la lignée LM7PC, dénommée MS7PG, et a été déposée le 8 janvier 1993 sous le n° V93010816.

A partir des cultures et des isolats précités, 35 caractérisés par des critères biologiques et morphologiques, on s'est ensuite attachés à caractériser le matériel nucléique associé aux particules virales produites dans ces cultures.

Ainsi les objets de la présente invention sont les suivants:

- humain, possédant une 5 un virus transcriptase inverse, associé à une famille d'éléments à sclérose associé la rétroviraux endogènes, et plaques, caractérisé en ce que son génome comprend une séquence nucléotidique présentant au moins 50 %, et de 10 préférence au moins 70 % d'homologie avec une séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID NO1, SEQ ID NO2, SEQ ID NO3, SEQ ID NO4, SEQ ID NO5, décrites à la Fig 5, et leurs séquences complémentaires;
- possédant virus humain, une un 15 transcriptase inverse, associé à une famille d'éléments associé sclérose rétroviraux endogènes, et à la plaques, caractérisé en ce que son génome code pour une séquence peptidique présentant au moins 50 %, préférence au moins 70 % d'homologie avec une séquence 20 peptidique codée par une séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID NO1, SEQ ID NO2, SEQ ID NO3, SEQ ID NO4, SEQ ID NO5, et leurs séquences complémentaires;
- un fragment nucléotidique caractérisé en ce qu'il comprend une séquence nucléotidique présentant au 25 moins 50 %, et de préférence au moins 70 % d'homologie avec une séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID N01, SEQ ID N02, SEQ ID N03, SEQ ID N04, SEQ ID N05 et leurs séquences complémentaires;
- undit fragment peut consister en une séquence 30 nucléotidique présentant au moins 50 %, et de préférence au moins 70 % d'homologie avec une séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID N01, SEQ ID N02, SEQ ID N03, SEQ ID N04, SEQ ID N05 et leurs séquences complémentaires;
- un ARN et/ou ADN et notamment vecteur de
   35 réplication, comprenant un fragment de l'invention;

- une amorce spécifique pour l'amplification par polymérisation d'un ARN ou d'ADN caractérisé en ce qu'elle comprend une séquence nucléotidique présentant au moins 50 %, et de préférence au moins 70% d'homologie avec au moins une partie d'un fragment de l'invention;
- unedite amorce a de préférence de 10 à 30 nucléotides;
- une sonde susceptible de s'hybrider spécifiquement avec un ARN ou d'un ADN d'un virus associé à la sclérose en plaques, caractérisée ce qu'elle comprend une séquence nucléotidique présentant au moins 50 %, et de préférence au moins 70 % d'homologie avec au moins une partie d'un fragment de l'invention;

10

- unedite sonde a de préférence au moins 10 15 nucléotides;
  - une utilisation d'une sonde de l'invention ou d'une amorce de l'invention pour détecter et/ou identifier dans un échantillon biologique un virus associé à la sclérose en plaques;
- une composition thérapeutique antisens notamment pour le traitement de la sclérose en plaques, comprenant au moins une séquence nucléotidique selon de l'invention;
- un procédé pour détecter et/ou identifier un virus associé à la sclérose en plaques, dans un
   25 échantillon biologique, caractérisé en ce qu'on expose un ARN et/ou un ADN spécifique audit virus, ou leur ARN et/ou ADN complémentaire, à au moins une séquence nucléotidique selon de l'invention;
- ledit procédé comprend de préférence, l'ARN et/ou l'ADN ou leur ADN et/ou 30 complémentaires, à la sonde, une étape d'hybridation dudit dudit ADN avec au moins une amorce et/ou ARN l'invention et une étape d'amplification dudit ARN et/ou ADN;
- 35 un procédé pour quantifier, dans un échantillon biologique, l'expression d'un virus associé à la sclérose

en plaques, caractérisé en ce qu'on expose un ARN et/ou un ADN spécifique audit virus, et/ou leur ADN et/ou ARN complémentaire, à au moins une sonde de l'invention;

- un peptide codé par la séquence nucléotidique du 5 génome d'un virus associé à la sclérose en plaques, caractérisé en ce qu'il est codé par au moins une partie d'un fragment nucléotidique de l'invention;
  - une protéine caractérisée en ce qu'elle comprend un peptide de l'invention;
- 10 un oligopeptide caractérisé en ce qu'il comprend au moins cinq aminoacides contigus du peptide de l'invention;
- une composition diagnostique, et/ou thérapeutique et/ou prophylactique, caractérisée en ce qu'elle
   comprend au moins un peptide de l'invention, ou au moins une protéine de l'invention, ou au moins un oligopeptide de l'invention.
  - une composition diagnostique, et/ou thérapeutique, et/ou prophylactique, comprenant un ligand
    spécifique à au moins un peptide, ou un oligopeptide, ou
    une protéine tels que définis précédemment.

Avant de détailler l'invention, différents termes utilisés dans la description et les revendications sont à présent définis :

- 25 - selon l'invention, un fragment nucléotidique ou oligonucléotide est un enchainement de caractérisé par la séquence informationnelle des acides nucléiques naturels, susceptibles de s'hybrider fragment nucléotidique dans des conditions prédéterminées, 30 l'enchaînement pouvant contenir des monomères structures différentes et être obtenu à partir d'une molécule d'acide nucléique naturelle et/ou par recombinaison génétique et/ou par synthèse chimique,
- ainsi un monomère peut être un nucléotide
   naturel d'acide nucléique dont les éléments constitutifs sont un sucre, un groupement phosphate et une base azotée;

dans l'ARN le sucre est le ribose, dans l'ADN le sucre est le désoxy-2-ribose; selon qu'il s'agisse de l'ADN l'ARN, la base azotée est choisie parmi l'adénine, l'uracile, la cytosine, la thymine; 5 nucléotide modifié dans l'un au moins des trois éléments constitutifs; à titre d'exemple, la modification peut intervenir au niveau des bases, générant des bases telles modifiées que l'inosine, la méthyl-5désoxycytidine, la désoxyuridine, la diméthylamino-5-10 désoxyuridine, la diamino-2,6-purine, la désoxyuridine et toute autre base modifiée favorisant l'hybridation, au niveau du sucre à savoir le remplacement d'au moins un désoxyribose par un polyamide (P.E. Nielsen et al, Science, 254, 1497-1500 (1991)), au niveau du 15 groupement phosphate par exemple son remplacement par des esters notamment choisis parmi les esters de diphosphate, d'alkyl et arylphosphonate et de phosphorothioate,

- par "séquence informationnelle", on entend toute suite ordonnée de monomères, dont la nature chimique et l'ordre dans référence un sens de constituent une information de même qualité celle que des acides nucléiques naturels,
- par hybridation, on entend le processus au cours duquel, dans des conditions appropriées, deux fragments
   nucléotidiques, ayant des séquences suffisamment complémentaires, s'apparient pour former un double brin,
- une sonde est un fragment nucléotidique comprenant au moins 10 monomères, avantageusement de 10 à 50 monomères, possédant une spécificité d'hybridation dans des conditions; une sonde peut être utilisée à des fins de diagnostic telles que les sondes de capture et/ou de détection ou à des fins de thérapie,
- la sonde de capture peut être immobilisée sur un support solide par tout moyen approprié, c'est-à-dire
   directement ou indirectement, par exemple par covalence ou adsorption passive,

- la sonde de détection est marquée au moyen d'un marqueur choisi parmi les isotopes radioactifs, des enzymes notamment choisis parmi la péroxydase et la phosphatase alcaline et ceux susceptibles d'hydrolyser un substrat chromogène, fluorigène ou luminescent, des composés chimiques chromophores, des composés chromogènes, fluorigènes ou luminescents, des analogues de bases nucléotidiques, et la biotine,
- les sondes utilisées à des fins de diagnostic de l'invention peuvent être mises en oeuvre dans toutes les 10 d'hybridation notamment techniques connues et techniques dites "DOT-BLOT" (MANIATIS et al, Molecular "SOUTHERN Cold Spring Harbor, 1982), Cloning, (SOUTHERN. E.M., J. Mol. Biol., 98, 503 (1975), "NORTHEN BLOT" qui est une technique identique à la technique 15 "SOUTHERN BLOT" mais qui utilise de l'ARN comme cible, la technique SANDWICH (DUNN A.R., HASSEL J.A., Cell, 12, 23 (1977)); avantageusement, on utilise la technique SANDWICH dans la présente invention comprenant une sonde de capture spécifique et/ou une sonde de détection spécifique, étant 20 entendu que la sonde de capture et la sonde de détection doivent présenter une séquence nucléotidique au moins partiellement différente,
- une autre application de l'invention est une 25 sonde de thérapie, ladite sonde étant susceptible de s'hybrider in vivo sur l'ARN et/ou sur l'ADN pour bloquer les phénomènes de traduction et/ou de transcription,
- une amorce est une sonde comprenant de 10 à 30 monomères, possédant une spécificité d'hybridation dans 30 des conditions déterminées pour l'initiation d'une polymérisation enzymatique par exemple dans une technique d'amplification telle que la PCR (Polymerase Chain Reaction), dans un procédé d'élongation, tel que le séquençage, dans une méthode de transcription inverse ou analogue,

- l'homologie caractérise le degré de similitude de deux fragments nucléotidiques comparés.

Etant donné qu'un virus possédant une activité enzymatique transcriptase inverse peut être génétiquement 5 caractérisé aussi bien sous forme d'ARN que d'ADN, il sera fait mention aussi de l'ADN que de l'ARN viral pour caractériser les séquences relatives à un virus possédant une telle activité transcriptase inverse.

- L'invention sera mieux comprise à la lecture de la description détaillée qui va suivre, faite en référence aux figures annexées dans lesquelles:
  - la figure 1 représente des séquences des fragments de type MSRV-1B obtenus après PCR dans la région "pol" définie par Shih et col.,
    - la figure 2 représente l'arbre phylogénique des séquences de type MSRV-1B obtenues par PCR dans la région "pol" définie par Shih et col.,
- la figure 3, donne la définition d'une trame de 20 lecture fonctionnelle pour chaque famille de type MSRV-1B/"PCR pol",
- la figure 4 représente selon Fig 4A un alignement des protéiques déduites des consensus A,B,C,D de type MSRV-1B avec des séquences de rétrovirus connus,
   25 selon Fig 4B l'arbre phylogénique, et selon Fig 4C l'homologie par rapport à ERV9,
- la figure 5, représente les consensus généraux en acides nucléiques des séquences MSRV-1B amplifiées par la technique PCR dans la région "pol" à partir d'ARN viral
   issu des lignées LM7PC et PLI-2, identifiées sous les références SEQ ID NO1, SEQ ID NO2, SEQ ID NO3 et SEQ ID NO4, et le consensus général avec amorces d'amplification référencée SEQ ID NO5.
- la figure 6, est une représentation de l'activité
   35 transcriptase inverse dans les fractions de saccharose prélevées sur un gradient de purification des virions

produits par les lymphocytes B en culture d'un patient atteint de SEP (l'activité transcriptase inverse (RT) est donnée en ordonnée en dpm (désintégrations par minute) et les numéros des fractions en abscisse),

- 5 la figure 7, est une représentation de l'activité transcriptase inverse, comme dans la figure 6, mais à partir d'une culture de lymphocytes B d'un témoin exempt de SEP,
- la figure 8, illustre les séquences consensus et 10 majoritaires de type MSRV-1B obtenues à partir des lymphocytes B d'un patient atteint de SEP selon Fig 8A, avec :
- \* MAJ correspondant à la séquence majoritaire dans laquelle les bases conservées dans tous les cas sont 15 représentées par ATGC, les bases majoritaires sont représentées par atgc et les bases délétées par rapport au consensus sont représentées par -,
- \* VAR correspondant à la séquence majoritaire (variation) dans laquelle les bases conservées par rapport 20 au consensus sont représentées par ., les bases minoritaires sont représentées par atgc et les bases délétées par rapport au consensus sont représentées par et
- \* MIN correspondant aux séquences minoritaires 25 (exception) dans lesquelles les bases conservées par rapport à la séquence majoritaire sont représentées par . et les bases délétées par rapport au consensus par -,

ainsi que la traduction de la séquence majoritaire, selon Fig 8B, dans laquelle la légende est la 30 suivante :

#### an: acides nucléiques:

- en gras, caractères de petites tailles: les sites de restriction des amorces
- en gras, caractères majuscules, extrémité 3º des 35 amorces

- en souligné, la séquence nucléique majoritaire codante

#### prot: séquence protéique:

- en souligné: acides aminés codés par les 5 amorces.

EXEMPLE 1: OBTENTION DE CLONES, DEFINISSANT UNE FAMILLE MSRV-1B, PAR AMPLIFICATION PCR "NICHEE" DES REGIONS POL CONSERVEES DES RETROVIRUS SUR DES PREPARATIONS 10 DE VIRIONS ISSUES DES LIGNEES LM7 ET PLI-2.

Une technique PCR dérivée de la technique publiée par Shih et coll. a été utilisée. Cette technique permet, par traitement de tous les composants du milieu réactionnel par la DNase, d'éliminer toute trace d'ADN contaminant.

- 15 Elle permet parallèlement, par l'utilisation d'amorces différentes mais chevauchantes dans deux successives de cycles d'amplifications PCR, d'augmenter les chances d'amplifier un ADNc résultant d'une quantité d'ARN faible au départ et encore réduite
- 20 l'échantillon par l'action parasite de la DNAse sur l'ARN; ce, d'autant plus la DNase est utilisée dans des conditions d'activité en excès qui permettent d'éliminer toute trace d'ADN contaminant avant inactivation de cette enzyme restant dans l'échantillon par chauffage à 85°C
- 25 pendant 10 minutes. Cette variante de la technique PCR décrite par Shih et coll, a été utilisée sur des fractions de virions, purifiés comme précédemment pour les surnageants congelés des cultures LM7, issus cette fois de lignée lymphoblastoïde B spontanée provenant d'un nouveau 30 cas de SEP, de la culture PLI-2 (ECACC n° 92072201) et de
- ocas de SEP, de la culture PLI-2 (ECACC n° 92072201) et de la culture LM7PC (ECACC n°93010817), ces deux dernières cultures ayant été obtenues selon les méthodes ayant fait l'objet du brevet n° WO 93/20188.

Les produits issus de la PCR et de la RT-PCR ont été 35 purifiés après purification sur gel d'agarose selon les méthodes conventionnelles (Sambrook J., Fritsch E.F., et

Maniatis T., Molecular cloning, a laboratory manual. Cold spring harbor laboratory press, 1989), puis resuspendu 10ml d'eau distillée. Une des propriétés Tag consistant à ajouter une polymérase 5 l'extémité 3' de chacun des deux brins d'ADN, l'ADN obtenu a été directement inséré dans un plasmide à l'aide du kit TA Cloning  $^{TM}$  (British Biotechnology). Les  $2\mu$ l de solution d'ADN ont été mélangés avec 5µl d'eau distillée stérile, d'un tampon de ligation 10 fois concentré  $2\mu$ l de "pCR<sup>TM</sup> VECTOR" (25 ng/ml) et  $1\mu$ l 10 LIGATION BUFFER", de "TA DNA LIGASE". Ce mélange a été incubé une nuit à 12°C. Les étapes suivantes ont été réalisées conformément kit instructions du TA Cloning® (British au Biotechnology). A la fin de la procédure, les colonies de bactéries recombinantes 15 blanches (white) ont repiquées pour être cultivées et permettre l'extraction des plasmides incorporés selon la procédure dite "miniprep" (Sambrook J., Fritsch E.F., et Maniatis T., Molecular cloning, a laboratory manual. Cold spring harbor 20 laboratory press, 1989). La préparation de plasmide de chaque colonie recombinante a été coupée par une enzyme de restriction appropriée et analysée sur gel d'agarose. Les plasmides possédant un insert détecté sous lumière UV après marquage du gel au bromure d'éthidium, sélectionnés pour le séquençage de l'insert, hybridation avec une amorce complémentaire du promoteur Sp6 présent sur le plasmide de clonage du TA Cloning Kit. La réaction préalable séquençage a ensuite au effectuée selon la méthode préconisée pour l'utilisation séquençage "Prism ready reaction kit dye 30 du kit de deoxyterminator cycle sequencing kit" (Applied Biosystems, ref. 401384) et le séquençage automatique a été réalisé l'appareil "automatic sequencer", modèle Applied Biosystems selon les instructions du fabricant.

Cette technique a d'abord été appliquée à deux fractions de virions purifiés comme décrit ci-après, sur

35

saccharose à partir de l'isolat "POL-2" produit par la lignée PLI-2 d'une part, et à partir de l'isolat MS7PG produit par la lignée LM7PC d'autre part: les surnageants de cultures sont collectés deux fois par semaine, 5 centrifugés à 10 000 tr/min pendant 30 minutes éliminer les débris cellulaires, et ensuite congelés à -80°C ou utilisés tels que pour les étapes suivantes. Les surnageants frais ou décongelés sont centrifugés sur un coussin de PBS-glycérol 30% à 100 000g (ou 30 000 tr/min 10 dans un rotor LKB-HITACHI de type 45 T) pendant 2h à 4°C. Après élimination du surnageant, le culot sédimenté est un petit volume de PBS et constitue repris dans fraction de virions concentrés, mais non purifiés. Le virus concentré est ensuite déposé sur un gradient sucrose dans un tampon PBS stérile (15 à 50% poids/poids) et ultracentrifugé à 35 000 tr/min (100 000g) pendant 12 h fractions un rotor à godets. 10 dans recueillies et 20µ1 sont prélevés dans chaque fraction homogénéisation pour doser l'activité y après transcriptase inverse selon la technique décrite par H. 140, 551-561). Les Perron et coll. (Res. Virol. 1989; fractions contenant le pic d'activité RT de type LM7 sont stérile dans du tampon PBS ensuite diluées ultracentrifugées une heure à 35 000 tr/min (1000 000 g) 25 pour sédimenter les particules virales. Le culot virions purifiés ainsi obtenu est alors repris dans un l'utilisation tampon adéquat pour volume d'un Tampon Guanidium sera faite (Ex. qui en ultérieure Thiocyanate pour l'extraction des ARN; PBS stérile pour le stockage à -80°C). 30

Les séquences clonées et séquencées à partir de ces deux échantillons ont été analysées à l'aide du logiciel geneworks®, sur la dernière version (n° 79, novembre 93) à ce jour de la banque de données genebank®. Elles correspondent à quatre catégories. Une première

catégorie de sequence (type 1), correspond à des sequences amplifiées à partir de matériel nucléique rétroviral contaminant la transcriptase inverse du MoMuLV utilisée pour l'étape de synthèse de l'ADN complémentaire, ainsi que cela a déjà été signalé précédemment. La deuxième catégorie (type 2), retrouvée dans la majorité des clones (55% des clones issus des isolats POL-2 des culture PLI-2, et, 67% des clones issus des isolats MS7PG des cultures LM7PC) correspond à une famille de séquences "pol" proches mais différentes du rétrovirus endogène humain dénommé ERV-9 ou HSERV-9.

La quatrième catégorie correspond à diverses séquences trouvées généralement en un exemplaire, ainsi qu'une de type rétroviral endogène, cependant jamais 15 retrouvées par d'autres approches ou dans d'autres échantillons provenant de culture exprimant une activité transcriptase inverse de type LM7.

La deuxième catégorie de séquences représentant la 20 majorité des clones est constituée de séquences dont la variabilité permet de définir quatre sous-familles de séquences. Ces sous-familles sont suffisamment proches entre elles pour qu'on puisse les considérer comme des quasi-espèces provenant d'un même rétrovirus, tel que cela 25 est bien connu pour le rétrovirus HIV-1 par exemple (Meyerhans et al., Cell 1989; 58, 901-910), ou comme le resultat de l'expression de plusieurs provirus endogènes co-régulés dans les cellules productrices, puisqu'appartenant à la même famille de rétrovirus endogène et donc sensibles 30 aux mêmes signaux de régulation générés éventuellement par le provirus réplicatif (Linial M.L. and Miller A.D. dans topics in microbiology and immunobiology. "Current Retroviruses, strategies of replication" vol. 157, p. 125-152; Swanstrom R. et Vogt P.K. editeurs, Springer-Verlag, 35 Heidelberg 1990). Cette nouvelle famille de rétrovirus endogènes ou, alternativement, cette nouvelle espèce

rétrovirale dont la génération de quasi-espèces a été obtenue en culture, et qui contient un consensus des séguences décrites à la suite est dénommée MSRV-1B.

5 Dans la figure 1 sont présentées les séquences des clones MSRV-1B séquencés lors de différents Ces séquences présentent une homologie expérience. acides nucléiques allant de 70% à 88% avec la séquence HSERV9 référencée X57147 et M37638 dans la base de données L'arbre phylogénétique de ces séquences est 10 Genebank. présenté dans la figure 2. Dans cette figure, les sousfamilles A, B, C D représentent les séquences qui ont été retrouvées de manière prépondérante dans des expériences similaires répétées ultérieurement, dans les échantillons d'ARN pur de virions purifiés avec les isolats MS7PG et 15 POL-2. A partir de ces familles de séquences, quatre représentatives séguences nucléiques "consensus" quasi-espèces différentes d'un rétrovirus MSRV-1B éventuellement exogène ou de différentes sous-familles d'un rétrovirus endogène MSRV-1B, ont été définies. Ces consensus représentatifs sont présentés dans la figure 3, avec la traduction en acides aminés. Une trame de lecture fonctionelle existe pour chaque sous-famille séquences MSRV-1B et l'on peut voir que la trame de lecture ouverte fonctionnelle correspond à chaque fois à la séquence acides aminés venant en deuxième ligne sous la séquence acide nucléique. Un alignement des consensus A,B,C,D et d'un consensus général traduits en protéine avec les séquences de rétrovirus connus est présenté dans la figure 4. Les consensus généraux en acides nucléiques 30 séquences MSRV-1B obtenues par cette technique PCR dans la région "pol" sont présentés dans la figure 5.

EXEMPLE 2: OBTENTION DE CLONES, DEFINISSANT UNE 35 FAMILLE MSRV-1B, PAR AMPLIFICATION PCR "NICHEE" DES

REGIONS POL CONSERVEES DES RETROVIRUS SUR DES PREPARATIONS DE LYMPHOCYTES B D'UN NOUVEAU CAS DE SEP.

même technique PCR modifiée d'après La 5 technique de Shih et coll. a été utilisée pour amplifier et séquencer le matériel nucléique ARN présent dans une purifiés au pic d'activité fraction de virions transcriptase inverse "de type LM7" sur gradient saccharose, selon les protocoles décrits dans l'exemple 1, 10 à partir d'une lignée lymphoblastoïde spontanée, obtenue par auto-immortalisation en culture de lymphocytes B d'un patient SEP séropositif pour le virus d'Epstein-Barr (EBV) après mise en culture des cellules lymphoïdes sanguine culture approprié contenant une dans milieu de appropriée 15 concentration de cyclosporine Une représentation de l'activité transcriptase inverse dans les fractions de saccharose prélevées sur un gradient de purification des virions produits par cette lignée (Duc.) est présentée dans la figure 6. De même, les surnageants culture d'une lignée B obtenue dans les 20 de conditions à partir d'un témoin exempt de sclérose plaques ont été traités dans les mêmes conditions et le l'activité transcriptase inverse dans fractions du gradient de saccharose s'est avèré négatif partout (bruit de fond) et est présenté dans la figure 7. La fraction 3 du gradient correspondant à la lignée B de même fraction sans activité transcriptase et la inverse du gradient témoin non-SEP, ont été analysées par la même technique RT-PCR que précédemment, dérivée de Shih suivie des mêmes étapes de clonage et de séquençage tels que décrites dans l'exemple 1.

L'analyse des clones recombinants prélevés au hasard a fourni les mêmes quatres catégories de séquences que précédemment. Les résultats sont présentés dans le tableau annexé. Il est tout à fait notable que les

séquences de type MSRV-1B soient retrouvées dans le seul matériel associé à un pic d'activité transcriptase inverse "de type LM7" provenant de la lignée lymphoblastoïde B de Ces séquences n'ont pas été retrouvées avec 5 matériel de la lignée lymphoblastoïde B témoin (non-SEP) dans 26 clones recombinants pris au hasard. Seules les séquences contaminantes de types Mo-MuLV et des séquences sans analogie rétrovirale particulière ont été retrouvées témoin. La différence de résultats chez ce hautement significative (chi-2, p<0,001).l'évidence L'analyse des séquences de type MSRV-1B obtenues à partir de la lignée B de ce patient SEP est présentée dans la figure 8 .

#### TABLEAU

#### REPARTITION DES SEQUENCES OBTENUES PAR PCR MODIFIEE D'APRES SHIH ET COLL. A PARTIR DE CULTURE DE LYMPHOCYTES B D'UN PATIENT ATTEINT DE SCLEROSE EN PLAQUES VERSUS UN PATIENT CONTROLE

	TYPE I	TYPE 2	TYPE 3 MSRV-2B	TYPE 4
	0	11	4	8
patient SEP	0%	48%	17%	35%
Lympho B	5	o	o	21
patient non SEP	19%	0%	0%	81%



humain, possédant une 1/ Virus transcriptase inverse, associé à une famille d'éléments associé à la sclérose rétroviraux endogènes, et 5 plaques, caractérisé en ce que son génome comprend une séquence nucléotidique présentant au moins 50 %, préférence au moins 70 % d'homologie avec une séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID NO1, SEQ ID NO2, SEQ ID NO4, SEQ ID NO5 et leurs séguences NO3, SEO ID 10 complémentaires.

humain, possédant une 2/ Virus transcriptase inverse, associé à une famille d'éléments associé à la sclérose rétroviraux endogènes, et plaques, caractérisé en ce que son génome code pour une séquence peptidique présentant au moins 50 %. 15 préférence au moins 70 % d'homologie avec une séquence peptidique codée par une séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID NO1, SEQ ID NO2, SEQ ID NO3, SEQ ID NO4 SEQ ID NO5 et leurs séquences complémentaires.

3/ Fragment nucléotidique caractérisé en ce qu'il comprend une séquence nucléotidique présentant au moins 50 %, et de préférence au moins 70 % d'homologie avec une séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID NO1, SEQ ID NO2, SEQ ID NO3, SEQ ID NO4, SEQ ID NO5 et leurs séquences complémentaires.

4/ Fragment selon la revendication 3, caractérisé en ce qu'il consiste en une séquence nucléotidique présentant au moins 50 %, et de préférence au moins 70 % d'homologie avec une séquence nucléotidique choisie parmi 30 SEQ ID N01, SEQ ID N02, SEQ ID N03, SEQ ID N04, SEQ ID N05 et leurs séquences complémentaires.

5/ ARN et/ou ADN et notamment vecteur de réplication, comprenant un fragment selon la revendication 3 ou 4.

35 6/ Amorce spécifique pour l'amplification par polymérisation d'un ARN ou d'ADN, caractérisée en ce qu'elle comprend une séguence nucléotidique présentant au moins 50 %, et de préférence au moins 70% d'homologie avec au moins une partie d'un fragment selon la revendication 3 ou 4.

- 7/ Amorce selon la revendication 6, caractérisée en ce qu'elle a de 10 à 30 nucléotides.
- 8/ Sonde susceptible de s'hybrider spécifiquement avec un ARN ou d'un ADN d'un virus associé à la sclérose en plaques, caractérisée ce qu'elle comprend une séquence 10 nucléotidique présentant au moins 50 %, et de préférence au moins 70 % d'homologie avec au moins une partie d'un fragment selon la revendication 3 ou 4.
  - 9/ Sonde selon la revendication 8, caractérisée en ce qu'elle a au moins 10 nucléotides.
- 10/ Utilisation d'une sonde selon la revendication 8 ou 9 ou d'une amorce selon la revendication 6 ou 7, pour détecter et/ou identifier dans un échantillon biologique un virus associé à la sclérose en plaques.
- 11/ Composition thérapeutique antisens notamment 20 pour le traitement de la sclérose en plaques, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins une séquence nucléotidique selon la revendication 8 ou 9.
- 12/ Procédé pour détecter et/ou identifier un virus associé à la sclérose en plaques, dans un 25 échantillon biologique, caractérisé en ce qu'on expose un ARN et/ou un ADN spécifique audit virus, ou leur ARN et/ou ADN complémentaire, à au moins une séquence nucléotidique selon la revendication 8 ou 9.
- 13/ Procédé selon la revendication 12, caractérisé 30 en ce que, avant d'exposer l'ARN et/ou l'ADN ou leur ADN et/ou ARN complémentaire, à la sonde, on hybride ledit ARN et/ou ledit ADN avec au moins une amorce selon la revendication 6 ou 7 et on amplifie ledit ARN et/ou ADN.
- 14/ Procédé pour quantifier, dans un échantillon 35 biologique, l'expression d'un virus associé à la sclérose en plaques, caractérisé en ce qu'on expose un ARN et/ou un

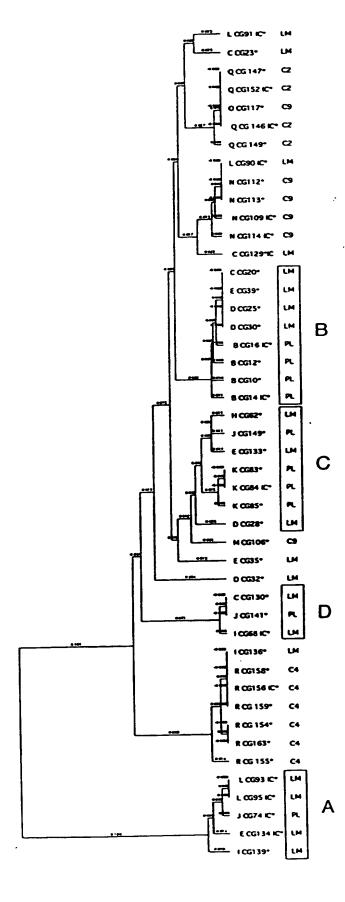
ADN spécifique audit virus, et/ou leur ADN et/ou ARN complémentaire, à au moins une sonde selon la revendication 8 ou 9.

- 15/ Peptide codé par la séquence nucléotidique du 5 génome d'un virus associé à la sclérose en plaques, caractérisé en ce qu'il est codé par au moins une partie d'un fragment nucléotidique selon la revendication 3 ou 4.
  - 16/ Protéine caractérisée en ce qu'elle comprend un peptide selon la revendication 15.
- 17/ Oligopeptide caractérisé en ce qu'il comprend au moins cinq aminoacides contigus du peptide selon la revendication 15.
- 18/ Composition diagnostique, et/ou thérapeutique et/ou prophylactique, caractérisée en ce qu'elle comprend la moins un peptide selon la revendication 15, ou au moins une protéine selon la revendication 16, ou au moins un oligopeptide selon la revendication 17.
- 19/ Composition diagnostique, et/ou thérapeutique et/ou prophylactique, caractérisée en ce qu'elle comprend 20 un ligand spécifique à au moins un peptide selon la revendication 15, ou à au moins une protéine selon la revendication 16, ou au moins un oligopeptide selon la revendication 17.

FIG 1

	-GITTROOG- ATACCOCTICA TOTOTTTOCT CHOCTACTOG COCCAGATOT	43
r cca3 ic.	-GITTAGG- ATAGCCCTCA TCTCTTTGGT CAGGIACTGG CCCAAGATCT	48
7 cc32 ic.	-GITTAGG- ATACCCCTCA TCTCTTTGGT CAGGTACTGG CCCAAGATCT	48
J 0374 IC*	-GITTAGG- ATAGCCCICA TCTCTTTGGT CAGGTACTGG CCCAAGATCT	48
I 03139*	-GITTA-GG- ATANCCCTCA TCTCTTTGGT CAGGTACTGG CCCAAGATCT	47
E CC134 IC*	-GITTA-GG- ATAGCCCCCA TCTATTTGCC CAAGCATTGG ATCCAAACTT	48
D 0235.	-GITCAGG- ATACCCCCA TCTATTICAL COACCATIGG ATCCCACT	48
H CG106*	-GTTCAGGE- ATAGCCCCCA TCTATTIGG. CACACATTAG CCCAAGACTT	47
9 C310.	TICHCCC- ATACCCCCA TCTATTTCCC CACCACTAG CTCAATACTT	-
5 C325*	-STYCHOOG - ATAGOCCCCA TOTATTTOOC CHOOCACTAG CTCAATACTT	43
2 030.	-CHYPACIC- ATROCYCCO TCTATTIGGC CAGGCACTAG CICAATACIT	48
	CONTRACTOR ATTACTOR TO TATTUTCO CACCOCACTAG CICAATACIT	48
€ 0020•	-GITCAGG- ATAGCCCCCA TCTATTTGGC CAGGCACTAG CTCAATACTT	48
5 CG12*	-GITCHOOG - ATACOCCCCA TCTATTTOOC CAGOCACTAG CTCAATACTT	43
E CC39*	-GITCAGG- ATAGCCCCCA TCTATTTGGC CAGGCACTAG CTCAATACTT	43
a CG14 IC*	-GITCAGG- ATACCCCCA TCTATTTGGC CACGCACTAG CTCAATACTT	48
3 cc16 ic.	TICANGS- ATAGCCCCCA TCTATTTGGC CAGGCATTAG CCCANG-CTT	47
R CG 154*	TICANG- ATACCCCOA TCIATTIGG CACCATTAS COCATACT	48
P. CC156 IC*	-GITCAVOG- ATAGOCCCCA TCTATTTOCC CAGGCATTAG COCAAG-CTT	48
I CG136*	-GITCAAGG- ATAGCCCCCA TCTATTIGGC CAGGCATTAG CCCAAGACTT	48
R CG 159*	-GITCHAG - ATAGOCCCA TCTATTTOC CHOCATTAG CCCAGACTT	48
R CG158*	-GITCHAGG- ATACCCCCA TCTATTICCC CACCCATTAG CCCAAGACTT	
R CG163*	TICAACG- ATACCCCCCA TICTATTICOC CACCCATTAG CCCAAGACTT	47
3 CG 155*	CONTRACT ATACOMON ATTATOMOST CACCAATTAG CUCAGGET	48
% ccs3.	CTTC ACC ATACOCCA TCTETTTCCC CACCATTAG CCCAGACTT	48
K CG84 IC*	CONTRACT - ATTACONOMY TOTATTOMY CACTURATING CLUMGACIT	48
K CC85*	CONTRACT ATROCCCUTA TOTATINGS CICECATING CUCAGACIT	48
	CONTROL ATACOMY A TOTATING CARGCATIAG CUCACACIT	48
D 0028*	-GITCAGGG- ATTAACCCCCA TCTATTTGGC CAGGCATTAG CCTAAGACTT	43
r ccai ic.	-GITCAAGA- ATAGTCCCCA TCTATTTOOC CAGOCATTAG CCCAAGACTT	48
0 CC117*	-GITCAACA - ATAGICCCCA TCTATTTOOC CACOCATTAG COCAACACTT	48
Q CG 147°	-GITCAACA- ATAGTOCCCA TCTATTTGCC CACGCATTAG CCCAACACTT	48
2 CG 146 IC*	-GITCARCA- AIRGICCCA ICIAITICAC CACCATINA CCAPACITI	48
ç ccisz ic•	-GITCAACA- ATAGICCCCA TCTATTICCC CACCCATTAG CCCAACACTT	48
Q CG 149*	-GTTCAAGA- ATAGTCCCCA TCTATTTCCC CAGCCATTCG CCCAAGACTT	48
Ē CG133*	-GITCAGGG- ATAGCCCCCA TCTATTICGC CAGGIATTAG CCCAAGACTT	
H CG62*	-GITCAGAG- ATAGCCCCCA TCTATTTCCC CAGGCATTAG CCCAAGACTT	48
J CG149*	-GITCAGGG- ATAGCCCCCA TCTATTTGGC CAGGCATTAG CCCAAGACIT	43
c ccs3.	CONCROTED ATACOCCCA TOTATTTGGC CAGGCATTAG CCCAAGACTT	49
E 035*	-CTYCE AND ATACOCCO TOTAL TOTAL TIGGE CAGGEATING COUNCECTT	48
N CC113.	CENTRATE ATROCCTOCA TOTATTIGGC CAGGLATIAG CCCAAGACTI	48
N CC114 IC*	CENTRACIG- ATACCERCA TETATTICCE CAGGEATTAG COUNGACTT	49
r ccan ic	CENTRACIC ATROCCICCA TCTATTIGGC CAGGCATIAG COCAAGACIT	48
	CONCROSS— APROXIMICA TOTATITICAS CAGGCATTAG COUNCACTI	48
N CG112*	CHREACHT ATRICTORY TO TETTING COCATAG COCAGACIT	48
N CG109 IC*	-CNICAGG- ATAGOCTOCA TCTATTTONE CAGGOATTAG NOCAACACTT	48
C CG129*IC	-GITCHOOG- ATROCTOCOA TCTATITICOC CTCCCATTAA COOCACTT	48
c carso.	-GITCAGG- ATACCTOCA TCTATTTOC CTGCATTAA COGGCACTT	48
J 03141*	CHICAGO ADACIOUX ICIATIOC CICCATDA COGGETT	48
	-GITCHOG- ADACTOCK TCTATTIGGC CROCATINA COURGACTT	48
I CC68 IC*	-GITCHOOG- ATMONTOCCA TCHAFFIGGE CHOCAFIMA COUGRACHT	48
I CC93 IC* L CC93 IC*	-GITCHEGG- ATRACTOCIA TCTATTIGGE CITGGATINA COLLEGE.TT AGENCITIC TCAGNOONG GOACHCIGIT CCTTCAG- 85	48
T CC53 IC. T CC52 IC.	ACCOUNT TOAGTOOK GONCTONT COTTONS 85	48
I CC93 IC* L CC93 IC*	ACCORDIC TORGICOR GONOTORI COTTORI- ACCORDIC TORGICOR GONOTORI COTTORI- ACCORDIC TORGICOR GONOTORI COTTORI- BOTTORIC TORGICOR GONOTORI COTTORI- BOTTORIC TORGICOR GONOTORI COTTORI- BOTTORI COTTORI- BOTTORI COTTORI BE	48
T CC53 IC. T CC52 IC.	ACCORDIC TOAGROUNG GONDERGIT COTTONG- 85 ACCORDIC TOAGROUNG GONDERGIC COTTONG- 85	48
J CG141* I CG68 IC* L CG93 IC* L CG95 IC* J CG74 IC*	AGCORCITO TORGITORG GORCICIGIT COTTORG- BE	48
J CE141* I CE58 IC* L CE93 IC* L CE95 IC* J CE74 IC* E CE134 IC*	ACCORTIC TOAGROUG GORCIGIT COTTOG- ACCORTIC TOAGROUG ACCORTIGIT COTTOG- ACCORTIC TOAGROUG ACCORTIGIT COTTOG- ACCORTIC TOAGROUG ACCORTIGIT COTTOG- ACCORTIC TOAGROUG ACCORTIGIT COTTOG-	48
J CC141* I CC58 IC* L CC93 IC* L CC95 IC* J CC74 IC* I CC139* D CC32*	AGCORTIC TOAGTOOR CONCINITION COURSETT  AGCORTIC TOAGTOOR CONCINITION COTTOG-  GRICOANTIC TOATROOTICS ACACTITICS COTTOG-  GRICOANTIC TOATROOTICS ACACTITICS CONTOG-  65	48
J CC141* I CC568 IC* L CC55 IC* J CC74 IC* I CC139* E CC134 IC* D CC32* M CC106*	AGCORCITO TOAGROUNG GOACROGIT COTTONS- GAGRONATIC TOARACTICG ACACTOTICG CONTONS- GAGRONATIC TOARACTICG ACACTOTICG CONTONS- AGCORCITO TOARACTICG CONTONS- AGC	48
J GE141* I GS68 IC* L GS95 IC* L GS95 IC* J GG74 IC* I GE139* E GE134 IC* D GG32* H GG106* B GG10*	AGCORCITO TORGITORG GORCITGITI COTTORG- GRICANITO TORGITORG ACACTOTIGI COTTORG- GRICANITO TORGITORG ACACTOTIGI COTTORG- GRICANITO TORGITORG ACACTOTIGI COTTORG- GRICONITO TORGITORG ACACTOTIGI COTTORG-	48
J CE141* I CE68 IC* L CE93 IC* L CE95 IC* J CE74 IC* I CE139* E CE134 IC* D CE32* M CE106* B CE10* D CE25*	AGCORCITO TORGITORG GORCITGITI COTTORG- GRICANITO TORGITORG ACACTOTIGI COTTORG- GRICANITO TORGITORG ACACTOTIGI COTTORG- GRICANITO TORGITORG ACACTOTIGI COTTORG- GRICONITO TORGITORG ACACTOTIGI COTTORG-	48
J CE141* I CO58 IC* L CO33 IC* L CO35 IC* J CC74 IC* I CE139* E CE134 IC* D CE32* M CE106* B CE10* D CE25* D CE30*	AGCORTIC TOMBROTHE ACCUSTIGE COTTONS  AGCORTIC TOMBROTH GOACHCIGIT COTTONS  AGCORTIC TOMBROTH GOACHCIGIT COTTONS  AGCORTIC TOMBROTH GOACHCIGIT COTTONS  AGCORTIC TOMBROTH GOACHCIGIT COTTONS  AGCORTIC TOMBROTH ACCUSTIGE COTTONS  GAGORITC TOMBROTH ACCUSTIGE COTTONS  65	48
J CE141* I CE58 IC* L CE33 IC* L CE35 IC* J CE74 IC* I CE134 IC* D CE32* M CE106* B CE10* D CE25* D CE30* C CE20*	AGRICACTIC TOAGRICAG GOACTCTGT CCTTCAG- AGRICACTIC TOAGRICAG ACACTCTGT CCTTCAG- GACCAGTIC TOAGRICAG ACACTCTGT CCTTCAG- AGRICACTIC TOAGRICAG ACACTCTGT CCTTCAG- AGRICACTTGT CCTTC	48
J CE141* I CO58 IC* L CC93 IC* L CC95 IC* J CG74 IC* I CE139* E CE134 IC* D CC32* H CE106* B CE10* D CC25* D CC30* C CC20* B CE12*	AGCORCITO TORGITORG GORCICIGIT COTTORG- GRICANITO TORGITORG ACACTOTIGI COTTORG- GRICANITO TORGITORG ACACTOTIGI COTTORG- GRICORGITO TORGITORG ACACTOTIGI COTTORG- GRICO	48
J CE141* I CO58 IC* L CE93 IC* L CE95 IC* J CG74 IC* I CE139* E CE134 IC* D CE25* D CE25* D CE25* D CE30* C CE20* B CE12* E CE39*	AGCORTIC TORGICUS GORCICIST COTTOG- AGCORTIC TORGICUS ACACTOTIST COTTOG- GAGORITIC TORTACTICS ACACTOTIST COTTOGS- GAGORITIC TORTACTICS ACACTOTIST COTTOGS- GAGORITIC TORTACTICS ACACTOTIST COTTOGS- GAGORITIC TORTACTICS ACACTOTIST COTTOGS- 66 GAGORITIC TORTACTICS ACACTOTIST COTTOGS- 67 GAGORITIC TORTACTICS ACACTOTIST COTTOGS- 68	48
J CE141* I CO58 IC* L CE93 IC* L CE95 IC* J CE74 IC* I CE139* E CE134 IC* D CE25* D CE25* D CE30* C CE20* B CE12* E CE39* B CE14 IC*	AGCORTIC TORGICOR GONCICTOT COTTOR— 85 AGCORTIC TORGICOR GONCICTOT COTTOR— 86 AGCORTIC TORGICOR GONCICTOT COTTOR— 86 AGCORTIC TORGICOR ADACTOTOT COTTOR— 86 GRICOATIC TORRACTER ADACTOTOT COTTOR— 86	48
J CE141* I CG68 IC* L CG93 IC* L CG95 IC* J CG74 IC* I CG139* E CG134 IC* D CG32* H CG106* B CG10* D CG25* D CG30* C CG20* B CG12* E CG39* E CG39* E CG14 IC* B CG16 IC*	AGCORPTIC TOMBROTHS ACACTOTIST COTTOGS  AGCORPTIC TOMBROTHS GOACTOTIST COTTOGS  AGCORPTIC TOMBROTHS GOACTOTIST COTTOGS  AGCORPTIC TOMBROTHS GOACTOTIST COTTOGS  AGCORPTIC TOMBROTHS GOACTOTIST COTTOGS  AGCORPTIC TOMBROTHS ACACTOTIST COTTOGS  GAGORATIC TOMBROTHS ACACTOTIST COTTOGS  GAGORA	48
J CE141* I CE68 IC* L CE93 IC* L CE95 IC* J CE74 IC* I CE139* E CE134 IC* D CE25* D CE26* D CE26* D CE26* E CE12* E CE39* B CE14 IC* E CE39* B CE16 IC*	AGCORTIC TORGICOR GORCICIGIT CCTTOR— AGCORTIC TORGICOR ADACTITIGI CCTTOR— AGCORTIC TORGICOR ADACTITIGI CONTOR— AGCORTIC TORGICOR ADACTITIGI CONTOR— AGCORTIC TORGICOR ADACTITIGI CCTTOR— AGCORTIT TORGICOR ADACTITIGI CCTTOR— AGCORTIT TORGICOR ADACTITIGI CCTTOR— AGCORTIT TORGICOR ADACTITICI CCTTOR— AGCORTIT TORGICOR ADACTICI CTTOR— AGCORTIT TORGICOR ADACTITICI CCTTOR— AGCORTIC TORGI	48
J CE141* I CE68 IC* L CE93 IC* L CE95 IC* J CE74 IC* I CE139* E CE134 IC* D CE25* D CE26* D CE26* D CE26* E CE12* E CE39* B CE14 IC* E CE39* B CE16 IC*	AGCORCITE TORGITURG GENERIGIT CETTURG- GRICANITE TORGITURG ACACTETIGI CETTURG- GRICANITE TORGITURG ACACTETIGI CETTURG- GRICORGITE TORGITURG ACACTETICI CETTURG-	48
J CE141* I CE68 IC* L CE93 IC* L CE95 IC* J CE74 IC* I CE139* E CE134 IC* D CE25* D CE30* D CE25* D CE30* C CE20* B CE12* E CE39* B CE14 IC* B CE16 IC* R CE 154* R CE156 IC*	AGCORDITE TOMBOURG GOACTOTHS COTTOG- RECORDITE TOMBOURG RECORDIT COTTOG- RECORDITE TOMBOURG RECORDIT CONTOG- RECORDITE TOMBOURG RECORDIT CONTOG- RECORDITE TOMBOURG RECORDIT COTTOG- RECORDITE TOMBOURG RECORDITE COTTOG- RECORDITE TOMBOURG REC	48
J GE141* I GG68 IC* L GG93 IC* L GG95 IC* J GG74 IC* J GG74 IC* D GG32* M GE106* B GE10* D GG25* D GG90* C GG20* B GE12* E GG39* E GG14 IC* B GG16 IC* R GG 154* R GG156 IC* I GE156*	AGCORCITE TOAGROUG GOACTCIGIT CETTOG- AGCORCITE TOAGROUG ACACTCIGIT CETTOG- AGCORCITE TOAGROUGA ACACTCICAT CETTITGG- AGCORCITIT TOAGROUGA ACACTCICAT CETTITGG-	48
J GE141* I GG68 IC* L GG93 IC* L GG95 IC* L GG95 IC* J GG74 IC* J GG74 IC* D GG32* M GG106* B GG10* D GG25* D GG30* C GG20* B GG12* E GG39* E GG39* B GG14 IC* B GG16 IC* R GG 154* R GG156 IC* I GG136* R GG 159*	AGCORCITE TORGITORS GORCICIST CETTORS  GRECORTITE TORGITORS ADACTITIST CETTORS  GRECORTITE TORGITORS ADACTITICAT CETTORS  GRECORTITE TORGITORS ADAC	48
J CE141* I CE58 IC* L CE33 IC* L CE35 IC* J CE74 IC* J CE139* E CE134 IC* D CE32* M CE106* B CE10* D CE25* D CE30* B CE12* E CE39* B CE14 IC* B CE16 IC* R CE 154* R CE156 IC* I CE136* R CE158*	AGCORDITE TOMBOURG GONCTOTATION COUNTRY  MACCORDITE TOMBOURG GONCTOTATION  MACCORDITE TOMBOURG GONCTOTATION  MACCORDITE TOMBOURG GONCTOTATION  MACCORDITE TOMBOURG GONCTOTATION  CAGGORDANITE TOMBOURG GONCTOTATION  CAGGORDANITE TOMBOURG MACCOTTATION  CHOOLOGITE TOMBOURG MACCOTTATION  COTTOGIC  COT	48
J CE141* I CE58 IC* L CE93 IC* L CE95 IC* J CE74 IC* I CE139* E CE134 IC* D CE32* M CE106* B CE10* D CE25* D CE30* B CE12* E CE39* B CE14 IC* R CE 154* R CE156 IC* I CE136* R CE 159* R CE158* R CE158* R CE158* R CE158*	AGCORDITI TOMBOURS ACACTORS CONTROLS SCREENING CONT	48
J GE141* I GG68 IC* L GG93 IC* L GG95 IC* J GG74 IC* J GG74 IC* J GG74 IC* D GG32* H GG106* B GG10* D GG25* D GG30* C GG20* B GG12* E GG39* E GG14 IC* B GG16 IC* R GG 154* R GG156 IC* I GG136* R GG 155* R GG158* R GG158* R GG 155*	AGCORDITI TOMBOURS ACACTORS CONTROLS SCREENING CONT	48
J GE141* I GG68 IC* L GG93 IC* L GG95 IC* L GG95 IC* J GG74 IC* J GG74 IC* J GG74 IC* D GG32* H GG106* B GG10* D GG25* D GG30* C GG20* B GG12* E GG39* B GG14 IC* R GG 154* R GG156 IC* I GG136* R GG 155* R GG 155* K GG83* K GG83*	AGCORCITE TORGITURG GORCITEGIT CETTURG- AGCORCITE TORGITURG ADACTITICI CETTURG- AGCORCITE TORGITURG ADACTICAT CETTURG- AGCORCITE TORGITURG ADAC	48
J GE141* I GG68 IC* L GG93 IC* L GG95 IC* L GG95 IC* J GG74 IC* J GG74 IC* J GG74 IC* D GG32* H GG106* B GG10* D GG25* D GG30* C GG20* B GG12* E GG39* B GG14 IC* R GG 154* R GG156 IC* I GG136* R GG 155* R GG 155* K GG83* K GG83*	AGCORCITE TORGITURG GORCITEGIT CETTURG- AGCORCITE TORGITURG ADACTITICI CETTURG- AGCORCITE TORGITURG ADACTICAT CETTURG- AGCORCITE TORGITURG ADAC	48
J GE141* I GG68 IC* L GG93 IC* L GG95 IC* L GG95 IC* J GG74 IC* J GG74 IC* D GG32* M GE106* B GE10* D GG25* D GG90* C GG20* B GE12* E GG39* E GG14 IC* B GG16 IC* R GG 154* R GG156 IC* I GG136* R GG156 IC* I GG136* R GG158* R GG163* R GG 155* K GG83* K GG83* K GG85*	AGCORDITE TOMBOTTES ACACTOTAT COTTOG- RECORDITE TOMBOTTES GOACTOTAT COTTOG- RECORDITE TOMBOTTES RECOTTAT COTTOG- RECOTTATOG- RECORDITE TOMBOTTES RECOTTAT COTTOG- RECORDITE TOMBOTTES RECOTTAT COTTOG- RECORDITE TOMBOTTES RECOTTAT COTTOG- RECORDITE TOMBOTTES RECOTTAT COTTOG- RECOTTATOG- RECORDITE TOMBOTTES RECOTTAT COTTOG- RECOTTATOG- RECOTT	48
J CE141* I COSS IC* L COSS IC* L COSS IC* J COT4 IC* I CE139* E CE134 IC* D CE32* M CE106* B CE106* D CE25* D CE300* E CE314 IC* E CE314 IC* E CE316* E CE31	AGCORCITE TORGITURG GORCICIGIT CETTURG- RECORCITE TORGITURG ROCCITIGIT CETTURG- RECORGITE TORGITURG ROCCITICIT CETTURG- RECORG	48
J GE141* I GG68 IC*  L GG93 IC* L GG95 IC* L GG95 IC* J GG74 IC* J GG74 IC* J GG74 IC* D GG32* M GG106* B GG10* D GG25* D GG90* C GG20* B GG12* E GG39* E GG14 IC* B GG16 IC* R GG 154* R GG156 IC* I GG136* R GG156 IC* I GG136* R GG156* R GG159* R	AGCORCITE TORGITORS GORCITIST CETTORS—85 AGCORCITE TORGITORS GORCITIST CETTORS—85 AGCORCITE TORGITORS GORCITIST CETTORS—85 AGCORCITE TORGITORS GORCITIST CETTORS—86 AGCORCITE TORGITORS GORCITIST CETTORS—86 AGCORCITE TORGITORS GORCITIST CETTORS—86 AGCORCITE TORGITORS ADACTITIST CETTORS—86 ACCORCITE TORGITORS ADACTITIST CETTORS—86 ACCORCITE TORGITORS ADACTITIST CETTORS—86 ACCORCITE TORGITORS ADACTITIST CETTORS—86 ACCORCITE TORGITORS ADACTITIST CETTORS—86 ACCORCITI TORGITORS ADACTITIST CETTO	48
J GE141* I GG68 IC* L GG93 IC* L GG95 IC* L GG95 IC* J GG74 IC* J GG74 IC* J GG74 IC* D GG32* M GE106* B GE10* D GG25* D GG90* C GG20* B GE12* E GG99* E GG154* R GG 154* R GG 155* R GG 155* R GG163* R GG 155* K GG84 IC* C GG17*	AGCORDITI TOMBOCING MACTOTATION CONTROL  AGCORDITI TOMBOCING GOACTOTATI  ACCORDITIC TOMBOCING GOACTOTATI  CATTOR—  ACCORDITIC TOMBOCING ACACTOTATI  COTTOR—  ACCORDITIC TOMBOCING ACACTOTATI  CO	48
J GE141* I GG68 IC* L GG93 IC* L GG95 IC* L GG95 IC* J GG74 IC* J GG74 IC* J GG74 IC* D GG32* M GG106* B GG10* D GG25* D GG30* C GG20* B GG12* E GG39* E GG154* R GG156 IC* I GG156* R GG 155* R GG156* R GG157* C GG17* O GG117* O GG117* O GG147*	AGECACTIC TOAGICOA GOACICIGIT COTTOAGAGACATTA COURACTT  AGECACTIC TOAGICOAG GOACICIGIT COTTOAGAGACACATTC TOAGICOAG GOACICIGIT COTTOAGAGACACACATTC TOAGICOAG GOACICIGIT COTTOAGAGACACACACACACACACACACACACACACACACACA	48
J GE141* I GG68 IC* L GG93 IC* L GG95 IC* L GG95 IC* L GG95 IC* J GG74 IC* J GG74 IC* J GG74 IC* D GG32* M GE106* B GE10* D GG25* D GG90* C GG20* B GE12* E GG99* B GE14 IC* B GE16 IC* R GG 154* R GG156 IC* I GE136* R GG156 IC* I GE136* R GG156 IC* I GE158* R GG163* R GG 155* K GG83* K GG84 IC* K GG83* K GG84 IC* C GG91 IC* O GG117* O GG 147*	AGCORCITE TORGITURG GORCITGIT CETTURG- RECORCITE TORGITURG ROCCITGIT CETTURG- RECORGITE TORGITURG ROCCITCIT CETTURG- RECORGITE TORGITURG ROCCITCAT CETTURG- RECORGITE TORGITUR	48
J GE141* I GG68 IC* L GG93 IC* L GG95 IC* L GG95 IC* L GG95 IC* J GG74 IC* J GG74 IC* J GG74 IC* D GG32* M GE106* B GE10* D GG25* D GG90* C GG20* B GE12* E GG99* B GE14 IC* B GE16 IC* R GG 154* R GG156 IC* I GE136* R GG156 IC* I GE136* R GG156 IC* I GE158* R GG163* R GG 155* K GG83* K GG84 IC* K GG83* K GG84 IC* C GG91 IC* O GG117* O GG 147*	AGCORCITE TORGITURG GORCITGIT CETTURG- RECORCITE TORGITURG ROCCITGIT CETTURG- RECORGITE TORGITURG ROCCITCIT CETTURG- RECORGITE TORGITURG ROCCITCAT CETTURG- RECORGITE TORGITUR	48
J GE141* I GG68 IC* L GG93 IC* L GG95 IC* L GG95 IC* L GG95 IC* J GG74 IC* J GG74 IC* J GG74 IC* D GG32* M GE106* B GE10* D GG25* D GG90* C GG20* B GE12* E GG99* B GE14 IC* B GE16 IC* R GG 154* R GG156 IC* I GE136* R GG156 IC* I GE136* R GG156 IC* I GE158* R GG163* R GG 155* K GG83* K GG84 IC* K GG83* K GG84 IC* C GG91 IC* O GG117* O GG 147*	AGCORCITE TORGITURG GORCITGIT CETTURG- RECORCITE TORGITURG ROCCITGIT CETTURG- RECORGITE TORGITURG ROCCITCIT CETTURG- RECORGITE TORGITURG ROCCITCAT CETTURG- RECORGITE TORGITUR	48
J GE141* I GG68 IC* L GG93 IC* L GG95 IC* L GG95 IC* L GG95 IC* J GG74 IC* J GG74 IC* J GG74 IC* D GG32* M GE106* B GE10* D GG25* D GG90* C GG20* B GE12* E GG99* B GE14 IC* B GE16 IC* R GG 154* R GG156 IC* I GE136* R GG156 IC* I GE136* R GG156 IC* I GE158* R GG163* R GG 155* K GG83* K GG84 IC* K GG83* K GG84 IC* C GG91 IC* O GG117* O GG 147*	AGECACTIC TOAGICOG GOACICIGIT COTTOG- AGECACTIC TOAGICOG ACCICTIGI COTTOG- AGECAGTIC TOAGACTIG ACACICTIGI COTTOG- AGECAGTIT TOAGACTIG ACACICTIGI COTTOG- AGECAGTIT TOAGACTIGA ACACICTOGT COTTOG- AGACOGTIC TOAGACTIGA ACACICTOGT COTT	48
J GE141* I GG68 IC* L GG93 IC* L GG95 IC* L GG95 IC* J GG74 IC* J GG74 IC* J GG74 IC* D GG32* H GG106* B GG10* D GG25* D GG30* C GG20* B GG12* E GG39* E GG39* B GG14 IC* R GG 154* R GG156 IC* I GG136* R GG 155* R GG156; R GG 155* K GG84* C GG158* C GG159* C GG146 IC* C GG17* C GG 146* C GG 146* C GG 149* E GG133*	AGECACTIC TOAGICOG GOACICIGIT COTTOG- AGECACTIC TOAGICOG ACACITIGI COTTOG- GACOAGITC TOAGACTIG ACACITIGI COTTOG- GACOAGITT TOAGACTIG ACACITIGI COTTOG- GACOAGITT TOAGACTIG ACACITIGI COTTOG- GACOAGITT TOAGACTIG ACACITICI COTTOG- GACOAGITT TOAGACTIGA ACACITICAT COTTOG- GACOAGITT TOAGACTIGA ACACITICAT COTTOG- GACOAGITT TOAGACTIGA ACACITICAT COTTIGG- GACOAGITT TOAGACTIGA ACACITICAT COTTITIGG- GACOAGITT TOAGACTIGA	48
J GE141* I GG68 IC* L GG93 IC* L GG95 IC* L GG95 IC* J GG74 IC* J GG74 IC* J GG74 IC* D GG32* H GG106* B GG10* D GG25* D GG30* C GG20* B GG12* E GG39* E GG39* B GG14 IC* R GG 154* R GG156 IC* I GG136* R GG 155* R GG156; R GG 155* K GG84* C GG158* C GG159* C GG146 IC* C GG17* C GG 146* C GG 146* C GG 149* E GG133*	AGECACTIC TOAGICOG GOACICIGIT COTTOG- AGECACTIC TOAGICOG ACACITIGI COTTOG- GACOAGITC TOAGACTIG ACACITIGI COTTOG- GACOAGITT TOAGACTIG ACACITIGI COTTOG- GACOAGITT TOAGACTIG ACACITIGI COTTOG- GACOAGITT TOAGACTIG ACACITICI COTTOG- GACOAGITT TOAGACTIGA ACACITICAT COTTOG- GACOAGITT TOAGACTIGA ACACITICAT COTTOG- GACOAGITT TOAGACTIGA ACACITICAT COTTIGG- GACOAGITT TOAGACTIGA ACACITICAT COTTITIGG- GACOAGITT TOAGACTIGA	48
J GE141* I GG68 IC* L GG93 IC* L GG95 IC* L GG95 IC* J GG74 IC* J GG74 IC* J GG74 IC* D GG32* H GG106* B GG10* D GG25* D GG30* C GG20* B GG12* E GG39* E GG39* B GG14 IC* R GG 154* R GG156 IC* I GG136* R GG 155* R GG156; R GG 155* K GG84* C GG158* C GG159* C GG146 IC* C GG17* C GG 146* C GG 146* C GG 149* E GG133*	AGECACTIC TOAGICOG GOACICIGIT COTTOG- AGECACTIC TOAGICOG ACACITIGI COTTOG- GACOAGITC TOAGACTIG ACACITIGI COTTOG- GACOAGITT TOAGACTIG ACACITIGI COTTOG- GACOAGITT TOAGACTIG ACACITIGI COTTOG- GACOAGITT TOAGACTIG ACACITICI COTTOG- GACOAGITT TOAGACTIGA ACACITICAT COTTOG- GACOAGITT TOAGACTIGA ACACITICAT COTTOG- GACOAGITT TOAGACTIGA ACACITICAT COTTIGG- GACOAGITT TOAGACTIGA ACACITICAT COTTITIGG- GACOAGITT TOAGACTIGA	48
J GE141* I GG68 IC* L GG93 IC* L GG95 IC* L GG95 IC* J GG74 IC* J GG74 IC* J GG74 IC* D GG32* H GG106* B GG10* D GG25* D GG30* C GG20* B GG12* E GG39* E GG39* B GG14 IC* R GG 154* R GG156 IC* I GG136* R GG 155* R GG156; R GG 155* K GG84* C GG158* C GG159* C GG146 IC* C GG17* C GG 146* C GG 146* C GG 149* E GG133*	AGECACTIC TOAGICOG GOACICIGIT COTTOG- AGECACTIC TOAGICOG ACACITIGI COTTOG- GACOAGITC TOAGACTIG ACACITIGI COTTOG- GACOAGITT TOAGACTIG ACACITIGI COTTOG- GACOAGITT TOAGACTIG ACACITIGI COTTOG- GACOAGITT TOAGACTIG ACACITICI COTTOG- GACOAGITT TOAGACTIGA ACACITICAT COTTOG- GACOAGITT TOAGACTIGA ACACITICAT COTTOG- GACOAGITT TOAGACTIGA ACACITICAT COTTIGG- GACOAGITT TOAGACTIGA ACACITICAT COTTITIGG- GACOAGITT TOAGACTIGA	48
J GE141* I GG68 IC* L GG93 IC* L GG95 IC* L GG95 IC* J GG74 IC* J GG74 IC* I GE139* E GE134 IC* D GG32* M GE106* B GE10* D GC25* D GG30* C GC30* B GE12* E GE39* E GE39* E GE36 IC* R GE 154* R GE156 IC* R GE 155* R GE156* R GE155* L GG91 IC* Q GE147* Q GE 147* Q GE 146* Q GE152 IC* Q GE 149* E GE133* H GG62* J GE149* E GE35*	AGECACTIC TOAGICUS GOACICIGIT COTTOS—85 AGECACTIC TOAGICUS GOACICIGIT COTTOS—86 AGECACTIC TOAGICUS GOACICIGIT COTTOS—86 AGECACTIC TOAGICUS GOACICIGIT COTTOS—84 AGECACTIC TOAGICUS ACACTITIGI COTTOS—86 AGECAGTIC TOAGACTIG ACACTITIGI COTTOS—86 AGECAGTIT TOAGACTIG ACACTITIGI COTTOS—86 AGECA	48
J GE141* I GG68 IC* L GG93 IC* L GG95 IC* L GG95 IC* J GG74 IC* J GG74 IC* I GE139* E GE134 IC* D GG32* M GE106* B GE10* D GC25* D GG30* C GC30* B GE12* E GE39* E GE39* E GE36 IC* R GE 154* R GE156 IC* R GE 155* R GE156* R GE155* L GG91 IC* Q GE147* Q GE 147* Q GE 146* Q GE152 IC* Q GE 149* E GE133* H GG62* J GE149* E GE35*	AGECACTIC TOAGICUS GOACICIGIT COTTOS—85 AGECACTIC TOAGICUS GOACICIGIT COTTOS—86 AGECACTIC TOAGICUS GOACICIGIT COTTOS—86 AGECACTIC TOAGICUS GOACICIGIT COTTOS—84 AGECACTIC TOAGICUS ACACTITIGI COTTOS—86 AGECAGTIC TOAGACTIG ACACTITIGI COTTOS—86 AGECAGTIT TOAGACTIG ACACTITIGI COTTOS—86 AGECA	48
J GE141* I GG68 IC* L GG93 IC* L GG95 IC* L GG95 IC* J GG74 IC* J GG74 IC* I GE139* E GE134 IC* D GG32* M GE106* B GE10* D GC25* D GG30* C GC30* B GE12* E GE39* E GE39* E GE36 IC* R GE 154* R GE156 IC* R GE 155* R GE156* R GE155* L GG91 IC* Q GE147* Q GE 147* Q GE 146* Q GE152 IC* Q GE 149* E GE133* H GG62* J GE149* E GE35*	AGECACTIC TOAGICUS GOACICIGIT COTTOS—85 AGECACTIC TOAGICUS GOACICIGIT COTTOS—86 AGECACTIC TOAGICUS GOACICIGIT COTTOS—86 AGECACTIC TOAGICUS GOACICIGIT COTTOS—84 AGECACTIC TOAGICUS ACACTITIGI COTTOS—86 AGECAGTIC TOAGACTIG ACACTITIGI COTTOS—86 AGECAGTIT TOAGACTIG ACACTITIGI COTTOS—86 AGECA	48
J GE141* I GG68 IC* L GG93 IC* L GG95 IC* L GG95 IC* J GG74 IC* J GG74 IC* I GE139* E GE134 IC* D GG32* M GE106* B GE10* D GC25* D GG30* C GC30* B GE12* E GE39* E GE39* E GE36 IC* R GE 154* R GE156 IC* R GE 155* R GE156* R GE155* L GG91 IC* Q GE147* Q GE 147* Q GE 146* Q GE152 IC* Q GE 149* E GE133* H GG62* J GE149* E GE35*	AGECACTIC TOAGICUS GOACICIGIT COTTOS—85 AGECACTIC TOAGICUS GOACICIGIT COTTOS—86 AGECACTIC TOAGICUS GOACICIGIT COTTOS—86 AGECACTIC TOAGICUS GOACICIGIT COTTOS—84 AGECACTIC TOAGICUS ACACTITIGI COTTOS—86 AGECAGTIC TOAGACTIG ACACTITIGI COTTOS—86 AGECAGTIT TOAGACTIG ACACTITIGI COTTOS—86 AGECA	48
J GE141* I GG68 IC* L GG93 IC* L GG95 IC* L GG95 IC* J GG74 IC* J GG74 IC* I GE139* E GE134 IC* D GG32* M GE106* B GE10* D GC25* D GG30* C GC30* B GE12* E GE39* E GE39* E GE36 IC* R GE 154* R GE156 IC* R GE 155* R GE156* R GE155* L GG91 IC* Q GE147* Q GE 147* Q GE 146* Q GE152 IC* Q GE 149* E GE133* H GG62* J GE149* E GE35*	AGECACTIC TOAGICUS GOACICIGIT COTTOS—85 AGECACTIC TOAGICUS GOACICIGIT COTTOS—86 AGECACTIC TOAGICUS GOACICIGIT COTTOS—86 AGECACTIC TOAGICUS GOACICIGIT COTTOS—84 AGECACTIC TOAGICUS ACACTITIGI COTTOS—86 AGECAGTIC TOAGACTIG ACACTITIGI COTTOS—86 AGECAGTIT TOAGACTIG ACACTITIGI COTTOS—86 AGECA	48
J GE141* I GG68 IC* L GG93 IC* L GG95 IC* L GG95 IC* J GG74 IC* J GG74 IC* I GE139* E GE134 IC* D GG32* M GE106* B GE10* D GC25* D GG30* C GC30* B GE12* E GE39* E GE39* E GE36 IC* R GE 154* R GE156 IC* R GE 155* R GE156* R GE155* L GG91 IC* Q GE147* Q GE 147* Q GE 146* Q GE152 IC* Q GE 149* E GE133* H GG62* J GE149* E GE35*	AGECACTIC TOAGICUS GOACICIGIT COTTOS—85 AGECACTIC TOAGICUS GOACICIGIT COTTOS—86 AGECACTIC TOAGICUS GOACICIGIT COTTOS—86 AGECACTIC TOAGICUS GOACICIGIT COTTOS—84 AGECACTIC TOAGICUS ACACTITIGI COTTOS—86 AGECAGTIC TOAGACTIG ACACTITIGI COTTOS—86 AGECAGTIT TOAGACTIG ACACTITIGI COTTOS—86 AGECA	48
J GE141* I GG68 IC* L GG93 IC* L GG95 IC* L GG95 IC* J GG74 IC* J GG74 IC* J GG74 IC* D GG32* M GG106* B GG10* D GG25* D GG30* C GG20* B GG12* E GG39* B GG14 IC* R GG 154* R GG156 IC* I GG166 IC* R GG 159* R GG158* R GG166 IC* I GG167 R GG 159* R GG158* R GG168 IC* I GG168* R GG169* C GG191 IC* O GG17* O GG17* O GG 147* O GG 147* O GG 147* O GG 148* E GG95* II GG14 IC* O GG133* II GG14 IC* II GG14 I	AGCORCITIC TORGITUDE GONCTOTIST CUTTURE— RECORCITIC TORGITUDE REACTITIST CUTTURE— RECORGITIC TORGITUDE REACTITIST CUTTURE— RECORGITIT TORGITUDE REACTITIST CUTTURE— RECORGITUDE TORGITUDE REACTITIST CUTTURE— RECORDITIO TORGITUDE	48
J GE141* I GG68 IC* L GG93 IC* L GG95 IC* L GG95 IC* J GG74 IC* J GG74 IC* J GG74 IC* D GG32* M GG106* B GG10* D GG25* D GG30* C GG20* B GG12* E GG39* B GG14 IC* R GG 154* R GG156 IC* I GG166 IC* R GG 159* R GG158* R GG166 IC* I GG167 R GG 159* R GG158* R GG168 IC* I GG168* R GG169* C GG191 IC* O GG17* O GG17* O GG 147* O GG 147* O GG 147* O GG 148* E GG95* II GG14 IC* O GG133* II GG14 IC* II GG14 I	AGCORCITIC TORGITUDE GONCTOTIST CUTTURE— RECORCITIC TORGITUDE REACTITIST CUTTURE— RECORGITIC TORGITUDE REACTITIST CUTTURE— RECORGITIT TORGITUDE REACTITIST CUTTURE— RECORGITUDE TORGITUDE REACTITIST CUTTURE— RECORDITIO TORGITUDE	48
J GE141* I GG68 IC* L GG93 IC* L GG95 IC* L GG95 IC* L GG95 IC* J GG74 IC* J GG74 IC* J GG74 IC* D GG32* H GG106* B GG10* D GG25* D GG30* C GG20* B GG12* E GG19* E GG154* R GG154* R GG156 IC* I GG136* R GG 155* R GG156* R GG158* R GG159* I GG114* C GG12* C GG12* C GG12* C GG12* C GG130*	AGECACTIC TOAGICUS GOACICIGIT COTTOS—85 AGECACTIC TOAGICUS GOACICIGIT COTTOS—86 AGECACTIC TOAGICUS GOACICIGIT COTTOS—86 AGECACTIC TOAGICUS GOACICIGIT COTTOS—84 AGECACTIC TOAGICUS ACACTITIGI COTTOS—86 AGECAGTIC TOAGACTIG ACACTITIGI COTTOS—86 AGECAGTIT TOAGACTIG ACACTITIGI COTTOS—86 AGECA	48

FIG 2



CONSENSUS A  STTTAGGGATAGCCC TCATCTCTTTGGTCA GGTACTGGCCCAAGA TCTAGGCCACTTCTC  / . G . P S S L W S G T G P R S R P L L  F R D S P H L F G Q V L A Q D L G H F S  L G I A L I S L V R Y W P K I . A T S Q	60
AGGTCCAGGCACTCT GTTCCTTCAG R S R H S V P S G P G T L F L Q V Q A L C S F	85
CONSENSUS B  GTTCAGGGATAGCCC CCATCTATTTGGCCA GGCACTAGCTCAATA CTTGAGCCAGTTCTC  V Q G . P P S I W P G T S S I L E P V L  F R D S P H L F G Q A L A Q Y L S Q F S  S G I A P I Y L A R H . L N T . A S S H	60
ATACCTGGACACTCT TGTCCTTCGGT IPGHSCPS YLDTLVLR TWTLLSFG	86
CONSENSUS C  GTTCAGGGATAGCCC CCATCTATTTGGCCA GGCATTAGCCCAAGA CTTGAGTCAATTCTC  V Q G . P P S I W P G I S P R L E S I L  F R D S P H L F G Q A L A Q D L S Q F S  S G I A P I Y L A R H . P K T . V N S H	60
ATACCTGGACACTCT TGTCCTTCAG I P G H S C P S Y L D T L V L Q T W T L L S F	85
CONSENSUS D  GTTCAGGGATAGCTC CCATCTATTTGGCCT GGCATTAACCCGAGA CTTAAGCCAGTTCTC  V Q G . L P S I W P G I N P R L K P V L  F R D S S H L F G L A L T R D L S Q F S  S G I A P I Y L A W H . P E T . A S S H	60
ATACGTGGACACTCT TGTCCTTTGG I R G H S C P L Y V D T L V L W	85

### FIG 4A

Consensus	SP.LFQALRP	30
Consensus	WKGSPAIFOS SMIKILEPFR KONPDIVIYO	30
HIV1 QG/YM	MKPSTATLOS ZAILUTTELLI LOTATIO	30
HIV2 QG/YM	WKGSPAIFOH IMROVLEPFR KANKOVIIIO	
VISNA QG/YM	WKLSPAVYOF TMOKILRGWI EEHPMIQFGI	30
	WKLSPSVYQF TMQETLEDWI QQHPETQFGI	30
CAEV QG/YM	MKNSPILCOK FVDKAILTVR DKYODSYIVH	30
MMIV QG/YM	WKWSPITCOK PADMATETAN DATOMITAN	
HERVK QG/YM	MINSPITCOT FYCRALOPVR EKFSDCYIIH	30
JSRV OG/YM	MINSPILCOK FVATALAPVR ORFPOLYLVH	30
	MANSPILCOK YVATALHKVR HAWKOMYIIH	30
MPMV QG/YM	MINDELLECK LANDER OVERCENTY	30
HILV1 QG/YM	FKNSPILFEM QLAHILQPIR QAFFQCTILQ	
HTLV2 QG/YM	FKNSPILFEQ QLAAVLNPMR KMFPISIIVQ	30
	FRDSPHIFGQ ALAQYLSQFSYLDILVLR	28
Trad cons30 B	FROSPHIFGO ALAODISOFSYLDILVIO	28
Trad cons33/28 C	FRISPHIEGO ALAQUISQUE SILBIBADO	28
Trad cons24 D	FRDSSHLFGL ALTRDLSOFSYVDILVLW	
ERV9 QG/YM	FRDSPHIFGQ ALAKDLIGHFSSPGILVLQ	28
	FRDSPHLFQQ VLAQDLGHFSGPGTLFLQ	28
Trad cons37 A	LUTOLITE OF ATTENDED POTOT -	

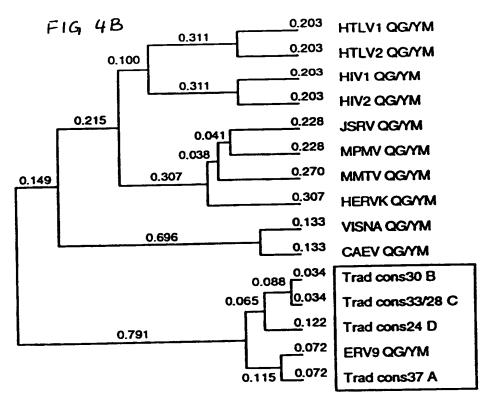


FIG 4C

714 40		Taille	% d'hamologie
Trad cons30 B Trad cons33/28 C Trad cons24 D	FRDSPHLFGQ ALAQDLSQFS Y.DTLVLQ	28 28 28 28 28 28 28 28	71% 79% 64% 100% 86%
Itau cuisi A	• • • • • • • • •		

FIG 5

CONSENSUS A

Consensus GTTTAGGGAT ANCOCTICATIC TICTTTGGTICA GGTACTGGCC CAAGATCTAG 50

Consensus GCCACTTICTC AGGTCCAGSN ACTICTIGTYCC TTICAG 85

(SEQ ID NO1)

CONSENSUS B

Consensus GTTCAGGGAT AGCCCCCATC TATTTGGCCA GGCACTAGCT CAATACTTGA 50

Consensus GCCAGTTCTC ATACCTGGAC AYTCTYGTCC TTCGGT 86

(SEQ ID NO2)

CONSENSUS C

Consensus GTICARRGAT AGCCCCCATC TATTIGGCCW RGYATIAGCC CAAGACTIGA 50

Consensus GYCAATTCTC ATACCTGGAC ACTCTTGTCC TTYRG 85

(SEQ ID NO 3)

CONSENSUS D

Consensus GTTCAGGGAT AGCTCCCATC TATTTGGCCT GGCATTAACC CGAGACTTAA 50

Consensus GCCAGTICTY ATACGTOCAC ACTICTIGNIC TITIES 85 (SEQ ID NO4)

CONSENSUS GENERAL MSRV-1B AVEC AMORCES D'AMPLIFICATION

Consensus GIGTIGCCAC AGGGGTTTAR RGATANCYCY CATCIMITIG GYCWRGYAYT

Consensus RRCYCRAKAY YTRRGYCAVT TCTYAKRYSY RGSNAYTCTB KYCCTTYRGT

Consensus ACATGCATCA C (SEQ ID NO5)

FIG 6

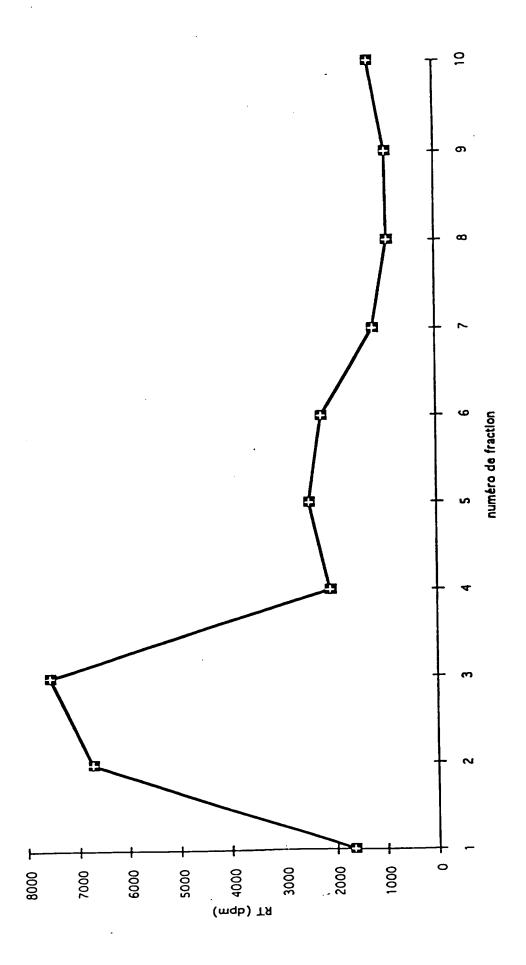


FIG 7

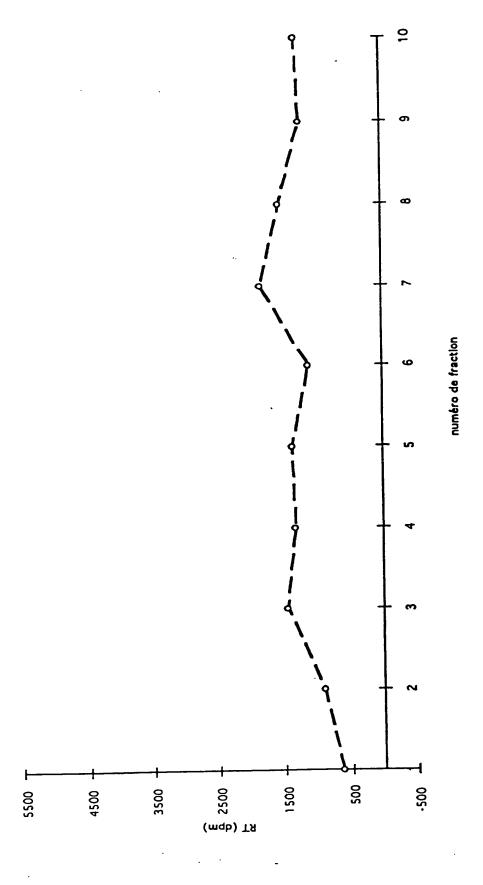


FIG BA

Consensus MAJ VAR	CTTGGATCCA GNGYTVMCMC ARGGGNNCAG GGN CTTGGATCCA GLGLTGCCAC AGGGGLTCAG GG- 	aTAGCCC	CCaTCTaT	tt	50 50 50
Consensus MAJ VAR	GGMCAGGSTA TTAGYCCAAG ACTTGAKCCA GNN GGCCAGGC-A TTAGCCCAAG ACTTGAGCCA Gtt agtt	CICATAC	CIGGA-CA	CT	100 100 98
Consensus MAJ VAR	CTTGCNCCTT CGGNACGRKG GNATGACMIN CTG CTTG-TCCTT CGGTAC-atG G-ATGACCTG CTG cgggG .ca.c CTG	AAGCTIG	AG-	143 141 137	
MIN			• • •	125	

FIG 8B

an	CTTOCATOCA GIGITGCCAC AGGGGTTCAG GGATAGCCCC CATCTATTIG	50
prot	VLPOGFR DSP HLFG	
an	GCCAGGCATT AGCCCAAGAC TIGAGCCAGT TCICATACCT GGACACICIT	100
prot	QALAQD LSQF SYL DT L	
an	GICCTICGGT ACATGGATGA CCTGCTGAAG CTTGAG	137
prot	V L R <u>Y M D D</u>	

INSTITUT NATIONAL

#### RAPPORT DE RECHERCHE PRELIMINAIRE

N° d'enregistrement

de la PROPRIETE INDUSTRIELLE

établi sur la base des dernières revendications déposées avant le commencement de la recherche FA 495572 FR 9401530

Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de bes des parties pertinentes	ein, de la demand examinée	le l
D,A	WO-A-93 20188 (BIO MERIEUX)  * le document en entier *	1,2	
<b>A</b>	AIDS RESEARCH AND HUMAN RETROVIRU vol.8, no.5, Mai 1992 page 922 H. PERRON ET AL 'Retrovirus iso from patients with multiple scler epiphenomenon or causative factor * abrégé *	olation rosis:	
D,A	LANCET THE, vol.337, no.8745, 6 Avril 1991, L pages 862 - 863 H. PERRON ET AL 'Isolation of r from patients with Multiple Scler * le document en entier *	retrovirus	
<b>A</b>	RESEARCH IN VIROLOGY, vol.143, no.5, 1992 pages 337 - 350 H. PERRON ET AL 'In vitro trans and antigenicity of a Retrovirus from a Multiple Sclerosis patient * le document en entier *	isolated	DOMAINES TECHNIQUE RECHERCHES (Inc.C.S) C07K C12N
D,A	JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY, vol.74, 1993 pages 65 - 72 H. PERRON ET AL 'Herpes Simplex ICPO and ICP4 immediate early prostrongly enhance expression of a retrovirus harboured by a leptome cell line from a patient with Mul Sclerosis' * le document en entier *	eningeal tiple	
	Date of achievament de	the recharche	- Demonstrates
	7 Octob	ore 1994 Lo	e Cornec, N
X : par Y : par	ticulièrement pertinent à lui seui ticulièrement pertinent en combinaisse avec un re-document de la même catégorie D	: théorie ou principe à la hase d : document de hrovet bénéfician à la date de dépôt et qui n'a ét de dépôt ou qu'à une date post : cité dans la domande : cité pour d'autres raisons	t d'une date azèleleure

INSTITUT NATIONAL de la

PROPRIETE INDUSTRIELLE

2

#### RAPPORT DE RECHERCHE PRELIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications déposées avant le commencement de la recherche 2715938 Nº Corregistrement national

> FA 495572 FR 9401530

DOC	JMENTS CONSIDERES COM				
Catégorie	Citation du document avec indication, en des parties pertinentes	cas de bessia,	de la demande examinée		
A	WO-A-93 07259 (SCLEROSE-FOR DANISH MS-SOCIETY )) * le document en entier *	ENINGEN ( THE	1-19		
D,A	CURRENT CONCEPTS IN MULTIPL 1991, AMSTERDAM, ELSEVIER pages 11 - 116 H. PERRON ET AL 'Isolatic unknown retrovirus from CSF brain cells of patients wit sclerosis' * le document en entier *	ns of an , blood, and	1,2		
				DOMAINES TECH RECHERCHES (I	NIQUES LCL5)
		,			
	Data d	achivament de la recherche		Dondardor	
		Octobre 1994	Le	Cornec, N	
X : put Y : put and A : put ou O : div	CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES  ticulièrement pertinent à lui sesi ticulièrement pertinent en combination avec un re document de la même extigorie tinent à l'encourre d'un moins une revendication arrière-plan technologique général miller plan technologique général minent intercalaire	T : théorie on princi E : document de bre à la date de éépi de dépôt ou qu'é D : cité dans la den L : cité pour d'autre	pe å la buse de l' vet bénéficiant d' it et qui n'a été ; une éste postèr ande s raisons	Tavantion Two date antirioure public qu'à cotte date oure.	